

FUSIONPROTEINS WITH PARTS OF IMMUNOGLOBULINS, THEIR PRODUCTION

Publication number: KR100249572 (B1)

Publication date: 2000-03-15

Inventor(s): LAUFER LEANDER [DE]; OQUENDO PATRICIA [PE]; ZETTLMEISSSL GERD [DE]; SEED BRIAN [US]

Applicant(s): GEN HOSPITAL CORP [US]; BEHRINGERWERKE AG [DE]

Classification:

- international: C07K14/195; A61K 38/00; A61K39/395; A61P7/04; A61P9/00; A61P13/12; A61P37/02; A61P37/08; C07K1/22; C07K14/005; C07K14/47; C07K 14/505; C07K14/52; C07K14/53; C07K14/535; C07K 14/54; C07K14/545; C07K14/55; C07K14/705; C07K 14/71; C07K14/715; C07K14/745; C07K16/00; C07K 19/00; C12N5/10; C12N9/44; C12N15/09; C12N15/62; C12P21/02; G01N33/50; G01N33/68; C12P21/04; C07K14/85; A61K38/00; A61K39/395; A61P7/00; A61P9/00; A61P13/00; A61P37/00; C07K1/00; C07K14/005; C07K14/435; C07K 16/00; C07K19/00; C12N5/10; C12N9/64; C12N15/09; C12N 15/62; C12P21/02; G01N33/15; G01N33/60; G01N33/68; (IPC1-7): C07K15/18

- European: C12N9/64F2C21M0; C07K14/47; C07K14/505; C07K14/715F; C07K14/745; C07K16/00; C12N15/62

Application number: KR19910010844 19910628

Priority number(s): DE19904020607 19900628

Also published as:

EP0464533 (A1)

EP0464533 (B1)

UY25897 (A1)

PT98113 (A)

PT98113 (B)

more >>

Abstract not available for KR 100249572 (B1)

Abstract of corresponding document: EP 0464533 (A1)

The invention relates to genetically engineered soluble fusion proteins consisting of human proteins or parts thereof not belonging to the Immunoglobulin family and various portions of the constant region of Immunoglobulin molecules. The functional properties of both fusion components are surprisingly retained in the fusion protein.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

| | |
|---|---|
| (51) Int. Cl. ⁶ C07K 15/18 | (45) 공고일자 2000년03월15일 |
| (21) 출원번호 10-1991-0010844 | (11) 등록번호 10-0249572 |
| (22) 출원일자 1991년06월28일 | (24) 등록일자 1999년12월27일 |
| (30) 우선권주장 P4020607.6 1990년06월28일 디제털 하스피탈 코포레이션 어이스트 엔. 헤이드 | 독일 1992-0000789 (43) 공개일자 1992년01월29일 |
| (73) 특허권자 미국 메사추세츠 02129 첼스토운 슈트 1101빌딩 149 썬리스 스트리트 베링베 르 캐 앤드 앤 캐写字楼 펄름 슈타인, 애리베르트 부그 | 독일연방공화국 대-3550 마브르크 1 포스토파치 1140 린더러우파 |
| (72) 발명자 독일연방공화국 대-3550마브르크빌더-포스-네그4 파트리치 아오쿠엔도 | 독일연방공화국 대-3550마브르크빌더-포스-네그4 게르트체풀마이슬 |
| (74) 대리인 미합중국메사추세츠 02114보스턴힐만빌딩프루트스트리트 이병호 | 독일연방공화국 대-3551란탈-그로스롭먼 양호피커 15 브리아인시드 |

심사관 : 한현숙

(54) 면역글로불린 부분을 갖는 융합 단백질 및 이의 제조방법

요약

본 발명은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 사람 단백질 또는 이의 일부, 및 면역글로불린 분자의 불변부의 다양한 부분으로 이루어지는, 유전공학적으로 처리된 가능성 융합 단백질에 관한 것이다. 놀랍게도, 2개의 융합 피트너의 작용성 특성이 융합 단백질내에 보유된다.

대표도

121 5'TCGCTCMAACCTCTCTGCTCGCTG660TCCTCG660CCAGCTG660CCGCTCTTCAGGCACT
CAGCCGACCTCTGCBAGACGAGCCAGCCAGACGCTCCAGCCGCGCCAGAGCTCTGA
[.....]
풀어 그늘을 베오바이드 1

161 ACACATACTGTCAGCATATAATTACTTGAGANTCAGCTTAATTTCAGACACATTTC
TCTTCTTACACCTCTCTATATTAAATGACCTTGTAGTTGATTGAGTCAGTCCTTAAG
[.....]
풀어 그늘을 베오바이드 2

171 AACTACTTCTTCAGTTTCAGACAGTATTCCTCCGAGACAGTTACCGGAGAGTACA
TTATGACACAGTCACAGTTCTACATAGGAGGGTTTGTCAATTGCGCTCTCACT
[.....]
풀어 그늘을 베오바이드 3

영세서

[발명의 명칭]

면역글로불린 부분을 갖는 융합 단백질 및 이의 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 트롬보풀라스틴 cDNA를 클로닝하기 위해 사용되는 서열로부터 유도된 2개의 올리고뉴클레오티드 프로브 분자를 나타낸 것이다.

제2도는 트롬보풀라스틴 아미노산 서열을 갖는 그룹 2b-Apr 5의 전체 서열을 도시한 것이다.

제3도는 트롬보풀라스틴 cDNA의 5'-비핵독 링크 또는 암호화영역에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 합성된 2개의 올리고뉴클레오티드를 나타낸 것이다.

제4도는 하이브리드 플라즈미드 pTF1Fc 5364를 도시한 것이다.

제5도는 IL-4 수용체 cDNA의 5'-비헤드 영역 또는 암호화 영역에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 합성된 2개의 올리고뉴클레오파이드를 나타낸 것이다.

제6도는 하이브리드 플라즈미드 pIL 4Fc 5364를 도시한 것이다.

제7도는 에리토로포이에인(EP0) cDNA의 개시 코돈의 근처에 있는 서열 및 경지코돈의 근처에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 합성된 2개의 올리고뉴클레오파이드를 나타낸 것이다.

제8도는 하이브리드 플라즈미드 pEP0Fc 5159를 도시한 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 사람 단백질 또는 이의 일부, 및 면역글로불린 분자의 불변부의 다양한 부분으로 이루어지는, 유전공학적으로 처리된 가공성 융합 단백질에 관한 것이다. 놀랍게도, 2개의 융합 파트너의 작용성 특성이 융합 단백질내에 보유된다.

유럽 공개특허공보 제325 262 호 제3 314 317호에는 사람 T 세포의 CD4 및 단백질의 다양한 도메인(domain) 및 사람 IgG1 부분으로 이루어진 이에 상응하는 융합 단백질이 기술되어 있다. 이를 융합 단백질을 몇몇은 세포-결합형 CD4 분자와 동일한 친화도로 사람 면역결합 바이러스의 등단백질 gp120에 결합한다. CD4 분자는 면역글로불린 계통군에 속하므로, 결합으로서 전적으로 면역글로불린 분자의 구조와 매우 유사한 3차 구조를 갖는다. 이러한 유사한 3차 구조는 또한 T-세포 항원 수용체의 α -쇄에 대해서도 적용되는데, 이러한 융합이 또 다른 문헌에 기술되어 있다[참조: Gascoigne 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84(1987), 2937-2940]. 그러므로, 매우 유사한 도메인 구조에 근거하여, 이 경우에, 융합 단백질에서의 2개의 융합 파트너의 생물학적 활성의 보유가 예상되었다.

바랑작하게는, 면역글로불린의 불변부의 아미노 말단에 커플링되어 있는, 본 발명에 따른 사람 단백질은 면역글로불린 계통군에 속하지 않아 하기 부류, 즉 (i) 세포와 도메인에 융합해서 전적으로 또는 부분적으로 혼입되어 있는 막-결합 단백질(특히, 트롬보플라스틴 및 시토킨 수용체 및 성장 인자 수용체(예: 인터루킨-4, 인터루킨-7, 풍향因子인 GM-CSF, G-CSF, 에리토로포이에인에 대한 세포성 수용체)가 있다);(ii) 융합에서 전적으로 또는 부분적으로 혼입되는 막-결합되지 않은 가공성 단백질로 나뉘어진다. 특히, 치료학상 중요한 단백질은 예를 들어, 에리트로포이에인 및 기타 시토킨 및 성장 인자들이다.

융합 단백질은 공지된 원핵 및 진핵 박테리아 시스템에서 제조할 수 있지만, 바랑작하게는 포유동물 세포(예: CHO, COS 및 BHK 세포)에서 제조할 수 있다.

본 발명에 따른 융합 단백질은 그들의 면역글로불린 부분 때문에, 전화 크로마토그라피에 의해 정제하기가 힘들어하여 생체내에서 가선된 암률통합학적 특성을 갖는다.

많은 경우에서, 융합 단백질에서의 Fc 부분은 치료 및 진단에서 사용하기에 상당히 유리하므로, 예를 들어, 가선된 암률통합학적 특성을 조절한다[참조: 유럽 공개특허공보 제323 262호]. 한편, 어떤 용도를 위해서는, 융합 단백질을 발현시키고 험하고 정제한 후에 수화된 유리한 방법으로 Fc 부분을 제거하는 것이 바랑작할 것이다. 이것은 Fc 부분이 치료 및 진단에서 사용하기에는 방해줄임이 일증되는 경우, 예를 들어, 융합 단백질이 면역반응에서 항원으로서 사용되는 경우에 해당된다.

상기 목적을 위해 사용하는 것이 가능할 수 있는, 혼존의 다양한 프로테아제가 있다. 예를 들어, 면역글로불리노로부터 F(ab) 단면을 생성시키기 위해 파파이아 및 페신이 사용되지만[참조: Immunology, ed. Polett, I. D., Gower Medical Publishing, London(1989)], 이들은 특장하게 특이적 방식으로 절단하지는 않는다. 대조적으로 융합인자 Xa는 단백질에서 바이오학적 특성을 가진 다른 태트라펩타드 서열 Ile-Glu-Gly-Arg을 인지하고 아르기닌 잔기 다음에 단백질의 가수분해작 결단을 수행한다. 언급된 태트라펩타드를 활용하는 서열은 나가이(Nagai) 및 토게르센(Thøgersen)에 의해 유전 공학적 방법으로 하이브리드 단백질에 최초로 도입되었다[참조: Nagai, K. 및 Thøgersen, H.C., Nature, vol. 309(1984), 810-812]. 상기 저자들은 이 물리에서 발현된 단백질이 실제적으로 결단되는 것을 보여줄 수 있었다. 하지만, 이러한 단백질이 진핵세포, 특히, 동물세포에서 발현되어 정제후에 인자 Xa에 의해 절단되는 가능성을 대해서는 아직까지 공개된 예가 없다. 그러나 동물세포에서의 본 발명에 따른 단백질의 발현이 바랑작한데, 이는 상기 타인의 세포 시스템에서만, 예를 들어, 정상적으로, 천연구조를 보유하므로 생물학적 활성을 보유한 융합 파트너로서의 막-결합 수용체의 분비가 예상되기 때문이다. 세포 배양 상황에 의한 예외는 융합 단백질의 속도의 차이로 인한 경제를 측정시켜준다.

따라서, 본 발명은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 사람 단백질 또는 이의 일부, 및 여러가지 아류의 면역글로불린(IgG, IgM, IgA, IgE)의 중쇄 또는 경쇄의 불변부의 다양한 부분으로 구성된, 유전공학적으로 처리된 가공성 융합 단백질에 관한 것이다. 사람 IgG, 특히 바랑작하게는 사람 IgG1의 중쇄의 불변부가 면역글로불리노에서 바탕작하여, 여기서 융합은 히지영역(hinge region)에서 발생한다. 특정 양태에서, Fc 부분은, 또한 혼입되는 결단 서열에 의해 간단한 방법으로 제거될 수 있고 인자 Xa를 사용하여 절단될 수 있다.

또한, 본 발명은 유전공학적으로 상기 융합 단백질을 제조하는 방법, 및 진단과 치료를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

최종적으로, 본 발명은 추가의 실시예에서 설명된다.

[실시예 1]

트롬보플라스틴 융합 단백질:

음혈은 인체에서 가장 중요한 과정이다. 음혈 캐스케이드(cascade)의 적당하게 예인한 조절이 있는데, 여기에는 다수의 세포선 인자와 혈장 단백질과 함께 작용한다. 전체로서의 상기 단백질(및 이의 보조인자들)이 음혈인자로 물리어진다. 음혈 캐스케이드의 최종 생상물은 혈소판의 응집률을 유발시키는 트롬빈, 및 혈소판 혈전을 안정화시키는 피브린이다. 트롬빈은 피브린으로부터의 피브린의 형성을 촉매하여 스스로는 프로트롬빈의 제한된 단백질 분해에 의해 형성된다. 혈소판은 인자 X(인자 Xa)는 상기 단계에 관여하여, 인자 Va 및 칼슘 이온의 존재 하에서, 혈소판 액과 결합하여 프로트롬빈을 절단시킨다.

인자 X가 활성화되기 위해서는 2가지 경로, 즉, 외성 경로와 내성 경로가 존재한다. 내성 경로에서는, 일련의 인자들은 단백질분해에 의해 활성화되어 그들 각각이 활성 프로테아제를 형성한다. 외성 경로에서는, 상상된 세포에 의해 트롬보플라스틴(조직 인자)의 합성이 증가되고, 증가된 트롬보플라스틴이 인자 VIIa 및 칼슘 이온과 함께 인자 X를 활성화시킨다. 트롬보플라스틴의 활성은 상기 반응에만 한정된다 그 앞서 가정되었었다. 그러나, 트롬보플라스틴/VIIa 복합체는 또한 인자 IX의 수준에서 내성 경로를 활성화시키는 것을 방해한다. 따라서, 트롬보플라스틴/VIIa 복합체는 음혈의 가장 중요한 생리학적 활성화의 하나이다.

그리므로, 트롬보플라스틴은 이의 전단 보조제(히기 참조)로서의 용도와는 별도로, 선천성 또는 후천성 음혈 질환을 치료하기 위한 치료학적 약제의 성분으로서 또한 사용될 수 있다고 생각할 수 있다. 이전에는 인자 VIIa, IX 또는 XI의 결핍에 의해 애기되는 만성 혈우병 또는, 예를 들어, 간 또는 신장 질병의 결과로 초래되는 그 밖의 긍정 응혈 장애이다. 외과 수술 개입후의 치료학적 약제로서의 용도 또한 생각할 수 있다.

트롬보플라스틴은 면역글로불린 계통물에 속하지 않는 온전한 액 단백질이다. 트롬보플라스틴 cDNA 서열은 총 4개의 그룹에 의해 공개되었다[참조: Fisher 등, Thromb. Res., vol. 48(1987), 89-99; Morrisey 등, Cell, vol. 50(1987), 129-135; Scarpati 등, Biochemistry, vol. 26(1987), 5234-5238; Spicer 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84(1987), 5149-5152]. 트롬보플라스틴 cDNA는 295개의 아미노산 전기의 풀리펩타드를 암호화하고, 이의 32개의 N-말단 아미노산이 시그널 펩타드로서 작용하는 개방 판크 프레임(open reading frame)을 형성한다. 속성한 트롬보플라스틴은 263개의 아미노산 전기를 포함하고 3개-도메인 구조, 즉, i) 아미노 말단 세포와 도메인(219개의 아미노산 전기); ii) 세포와 도메인에 N-글리코실화를 위한 3개의 포토설크리부위가 존재한다(Asn-X-Tyr). 트롬보 플라스틴은 정상적으로 글리코실화되거나 글리코실화하는 단백질의 활성을 위해 필수적인 것으로 보이지는 않는다[참조: Pabor sky 등, Biochemistry, vol. 29(1989), 8072-8077].

트롬보플라스틴은 음혈의 전단 상시형에서 활성 생물에 대한 보조제로서 요구된다. 시험받는 환자의 음혈 상태는 1-단계 프로트롬빈 혈형 형성 시각 결정에 의해 알 수 있다(예: Quick's test). 전단상 시험에 요구되는 트롬보플라스틴은 현재 사람 조직으로부터 획득하여, 제조방법은 표준화하기 어렵고, 수율은 낮아서 상당한 양의 사용을 출발물질(대안)이 공급되어야 한다. 한편, 현연의 액-겔화 트롬보플라스틴의 유전 공학에 의한 제조는 복잡한 경제 방식 때문에 또한 어려울 것이라 예상된다. 상기 문제점들은 면역글로불린 부분으로의 본 면밀화에 따른 유통에 의해 회피될 수 있다.

본 발명에 따른 트롬보플라스틴 용합 단백질은 포유동물 세포(예: CHO, BHK, COS 세포)에 의해 배양 배지로 분비되고 단백질 A-세포로 조상에서의 전화 크로마토그래피로 정제되어 1-단계 프로트롬빈 혈형 형성시간 절약에서 놀랄정도로 높은 활성을 갖는다.

트롬보플라스틴 cDNA의 즐려닝

공개된 서울[참조: Scarpati 등, Biochemistry, vol. 26(1987), 5234-5238]을 트롬보플라스틴 cDNA를 즐려닝하는데 사용된다. 2개의 물리적 유래오타이드 프로브 분자(제1도 참조)가 이를 공개된 서울로부터 유도된다. 상기 2개의 프로브 분자는 사용 테스트로부터 cDNA 링크를 스크리닝하는 데 사용한다[참조: Grundmann 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83(1986), 8024-8028].

다양한 길이의 cDNA 클론을 수득한다. 후속의 과정에서 사용되는 하나의 클론인 26-APr5는 스카프리(Scarpati)등에 의해 기술된 cDNA와 동일한 아미노산 서열을 암호화한다.

트롬보플라스틴 용합 단백질을 암호화하는 하이브리드 플라스미드 pTF1c의 제작

플라스미드 pCD4E 강마 1(유럽 공개허용번호 제 325 262 A2호; ATCC에 수록번호 제 67610호로 기록되어 있음)을 사용 pCD4 유전체 및 사람 IgG1으로 구성된 용합 단백질을 발현시키는데 사용한다. cDNA의 세포외도메인을 암호화하는 DNA 서열은 제한 효소 HincII III 및 BamHI를 사용하여 상기 플라스미드로부터 제거한다. 이 경우에, 단지 부분적 결단 만을 효소 HincII를 사용하여 수령하여, pCD4E 강마 1은 함유되어 있는 2개의 HincII 부위만 단지 단지(1위 2198bp)을 결단해낸다. 결과로 전자세포 전자조절서열(프로모터)이 개방 HindIII 부위에 이어지는 개방된 백터에 초래된다. 개방 BamHI 부위는 팬타-펩타드 링커를 위한 암호화 영역의 출발점에 위치하고 인자와 사람 IgG1의 C2 및 C3 도메인이 그뒤에 이어진다. BamHI 인자 서열 GGATCC에서 판독 프레임은 GAT가 아스파르트산으로서 해독되도록 하는 것이다.

일반 점성 DNA 물리머리제를 사용한 DNA 즐록은 목적하는 서열이 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 부착되도록 하는 방식으로 소정의 서열을 변형시킬 수 있다. 트롬보플라스틴 cDNA의 5'-비해독 영역(A: 5' GATCGATTAAAGCTTCTGGAAACCCCTCGATCTCCGCC 3') 또는 3'-암호화 영역(B: 5' GCTATCTGGATCCCGTGAAATTTCTCTGAAITCCCC 3')에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 2개의 물리적 유래오타이드를 합성한다. 이를증에서, 물리적 유래오타이드 A는 암호화체의 서열과 부분적으로 동종성이고 물리적 유래오타이드 B는 비-암호화체와 부분적으로 동종성이다(제3도 참조).

그리하여, 즐록을 통해(암호화체를 기준으로 하여) 암호화 서열의 출발점인 5' 말단에 있는 HindIII 부위 및 막단한 영역의 첫번쨰 3개의 아미노산 전기是为了 코돈인 3' 말단에 있는 BamHI 부위를 함유하는 DNA 단편(827 bp)을 수득한다. BamHI 절단 부위에 있는 판독 프레임은 pCD4E 강마 1에 있는 BamHI 부

위와의 연결이 트롬보글라스틴 cONA의 개시 코돈에서부터 IgG1 중쇄의 경지코돈에 걸쳐 연속적인 판독 프레임과의 유전자 응합을 초래하도록 하는 것이다. 목적하는 단편을 수득하고 HindIII 및 BamHI으로 처리한 후, 심기와 같이 HindIII(부분적으로) 및 BamHI으로 결단시킨 벡터 pCD4E 감마 1으로 연결시킨다. 생성된 플라즈미드를 pTIFc라고 명명한다(제4도 참조).

포유동물 세포로의 pTIFc의 경질 영양

플라즈미드를 pTIFc에 의해 양호화된 응합 단백질은 이후로 pTIFc로 명명한다. pTIFc는 COS 세포에서 일시적으로 발현시킨다. 이 목적은 위해, COS 세포를 DEAE-액스트란의 보호하에 pTIFc로 경질감염시킨다(증: 유럽 공개특허公报 제 325 262호). 각각 연역학경변 조사는 형질감염된 세포의 비율이 약 25%임을 나타내었다. 형질감염시킨 24시간 후에, 세포를 절정없는 배지로 옮기나, 이 세포 상층액을 3일이 더 지난 후에 수거한다.

세포 배양 상층액으로부터 pTIFc 융합 단백질의 제작

일시적으로 경질영양 COS 세포로부터의 상층액 170ml을 0.8ml의 단백질 A-세파로즈를 활용한 컬럼에서 배치 방법으로 4°C에서 밤새 수집하고, 10회 웅적의 세척 용액(50mM 트리스 용액(pH 8.6), 150mM NaCl)으로 세척하고 응축 용액(93.7 100mM 시트르산: 100mM 시트르산 낫트륨)을 사용하여 0.5ml의 분획으로 풍출시킨다. 처음의 9회 분획을 각 경우마다 2mL 트리스 용액(pH 8.6) 0.1mL를 사용하여 즉시 중화시킨후 혼합하여, 생성된 단백질을 아미콘 미소스총기(Amicon microconcentrator)(Centriflon 30)에서 3회 농축/회석 주기 수령함으로써 TNE 용액(50mM 트리스 용액(pH 7.4), 50mM NaCl, 1mM EOTA)으로 끌인다. 이런 방법으로 수득된 pTIFc를 SOS-PAGE 전기기생에 의해 정제한다(증: U.K. Lemall, Nature 227(1970) 680-685). 한편의 부재하여, pTIFc는 SOS-PAGE에서 이중체(약 165kDa)처럼 나타난다.

프로트롬빈 혈병 형성 시간 결정에서 경제된 TFIFc의 생물학적 활성

TFIFc 융합 단백질은 1-단계 프로트롬빈 혈병 형성 시간 결정에서 낮은 농도(50ng/ml 미만)에서 활성이 있다(증: Vinazzer, H. *Gerinnungsphysiologie und Methoden im Blutgerinnungslabor*(1979), Fisher Verlag Stuttgart). 달성된 혈병 형성 기관은 사람 대장으로부터 분리된 트롬보글라스틴을 사용한 경우 수득한 혈병 형성 시간과 비교한다.

[실시예 2]

인터루킨-4 수용체 응합 단백질

인터루킨(IL-4)는 T 세포에 의해 활성화되어 B-세포 증식을 자극할 수 있기 때문에 초기에는 B-세포 성장 인자로 양호화되었다. 인터루킨(IL-4)는 상기 세포들에게 많은 영향을 끼쳤다. 특히 한가지는 활성화된 B 세포에서 면역글로불린 아류인 IgG1 및 IgE의 분자들의 혼합을 자극하는 것이다(증: Coffmann 등, *Immunol. Rev.*, vol. 102(1988) 5). 또한, IL-4는 T 세포 및 기타 혈모포이에릭 세포(hemopoietic cell)의 증식 및 분화를 조절한다. 그리하여, 알레르기성 반응 및 기타 연역학적 반응의 조절에 기여한다. IL-4는 특정 수용체에 높은 친화도를 가지고 결합한다. 사람 IL-4를 양호화하는 cDNA가 분리되었다(증: Izdebski 등, *J. Exp. Med.*, vol. 171(1990) 861-873). IL-4 수용체가 시그널 패턴으로서 작용하는 25개의 N-말단은 아미노산을 갖는다. 총 285개의 아미노산으로 구성되어 있다는 것이 cDNA 서열로부터 추론된 아미노산 서열의 분석으로부터 명백하다. 성숙한 사람 IL-4 수용체는 800개의 아미노산으로 구성되어 트롬보글라스틴 처럼 3개-도메인 구조, 즉 i) 아미노 말단 세포와 도메인(207개의 아미노산); ii) 중간 영역(24개의 아미노산); 및 iii) 세포질 도메인(563개의 아미노산)을 갖는다. 세포외 도메인에는, N-글리코사일화를 위한 61개의 포慎설 부위가 존재한다(Asn-X-Thr/Ser). IL-4 수용체는 사람 IL-6 수용체, 사람 IL-2 수용체의 β-서브 유니터, 마우스 에리트로포이에인 수용체 및 대토 프로락틴 수용체와 증명성을 갖는다(증: Izdebski 등, *Icic. cit.*). 그리하여, 트롬보글라스틴처럼, 면역글로불린 계통군의 일원이 아니고 헤모포이에린 수용체의 신규 계통군으로 언급되는 통증성 단백질과 함께 활당된다. 상기 계통군의 일원은 4개의 시스테인 친화기 가지며 통증적 막형단 영역 극처에 위치하는 세포외 도메인에 보존 서열(Trp-Ser-X-Trp-Ser)을 갖는다.

IL-4 수용체 시스템의 상기 언급은 작용을 근거로 하여, IL-4 중개된 면역 반응(예: 이식거부반응, 자가면역질병, 알레르기성 반응)을 억제하기 위해 IL-4 수용체의 조제한 형태의 치료학적 용도가 가능하다.

치료하기 위해 요구되는 물질의 양은 유전학적으로 이러한 분자를 제조하는 것이 필수적이도록 한다. 친화 크로마토그라피에 의한 간단한 경제 및 개선된 액체동적학적 특성으로 인해, 본 발명에 따른, 면역글로불린 응합 단백질로서의 가능성 형태의 IL-4 수용체의 합성은 특히 유리하다.

IL-4 수용체 응합 단백질은 포유동물 세포(예: CHO, BHK, COS 세포)에 의해 배양 배지로 분비되고 단백질 A-세파로즈상에서 친화 크로마토그라피에 의해 경제되어, 높은 개도, 온전한 막-결합 IL-4 수용체 분자의 세포외 도메인과 동일한 작용성 특성을 갖는다.

IL-4 수용체 응합 단백질을 양호화하는 하이브리드 플라즈미드 pIL-4RFc의 제작

플라즈미드 pCD4E 감마 1을 XbaI 및 BamHI를 사용하여 절단하여 개방 XbaI 부위가 프로모터 서열로부터의 하부에 위치하는 개방된 벡터를 초래한다. 개방 BamHI 부위는 펜타펩타드 릴카를 위한 양호화 영역의 출발점에 위치하고 현저와 IgG1의 C42 및 C43 도메인에 그부에 이어진다. BamHI 임지 서열 GGATCC에서 판독 프레임은 GAT가 아스파르ти드산으로 해독되도록 하는 것이다. 열연경성 RNA 폴리아리제를 사용한 RNA 증폭은 목적하는 서열이 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 부착되도록 하는 방식으로 소정의 서열을 변형시킬 수 있다. 벡터 pCD4E/2T-2B[증: Izdebski 등, *Icic. cit.*]에서 클론된 IL-4 수용체 cDNA의 5'-비핵적 영역(A: 5' GATCCAGACTCGAACAGAAAGCGGCGCTGGCTCATCC 3') 또는 양호화 영역(B: 5' CTATGACATGGATCTCTGAGGGCTCTCTGAGGTTGTG 3')에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 2개의 올리

고뉴클레오티드를 형성한다. 이들중에서, 올리고뉴클레오티드 A는 암호화체의 서열과 부분적으로 동종성이고 올리고뉴클레오티드 B는 비-암호화체와 부분적으로 동종성이다(제5도 참조). 열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한 증폭은 암호화체를 기준으로 하여, 암호화 서열의 출발점 전의 5' 일단에 있는 XbaI 부위 및 세포외 도메인의 마지막 코돈전의 3' 일단에 있는 BamHI 부위를 형유하는 DNA 단편(838 bp)을 초래한다. BamHI 절단 부위에 있는 팁드 프레임은 pCD4E 강마 1에 있는 BamHI 부위와의 연결이 IL-4 수용체 cDNA의 개시 코돈에서부터 1961의 정지코돈에 걸쳐 연속적인 팁드 프레임과의 유전자 융합을 초래하도록 하는 것이다. 목적하는 단편을 수득하고, XbaI 및 BamHI으로 처리한 후, 상기와 같이 XbaI/BamHI으로 절단시킨 벡터 pCD4E 강마 1에 연결시킨다. 생성된 플라즈미드를 pIL4Rfc라고 명명한다(제6도 참조).

세포들을 세포포의 pIL4Rfc의 형질강화

플라즈미드를 pIL4Rfc에 의해 암호화된 융합 단백질은 이후로 pIL4Rfc로 명명한다. pIL4Rfc는 COS 세포에서 일시적으로 발현시킨다. 이 목적을 위해, COS 세포를 OEEAE-엑스트란의 보조하에 IL4Rfc로 형질강화시킨다(참조: 유럽 공개특허 공보 제0 325 262호). 간접 면역형광법 조사는 형질강화된 세포의 비율이 약 25%로 나타나되었다. 형질강화시킨자 24시간 후에, 세포를 유행 없는 배지로 옮긴다. 이 세포 상층액을 추가의 3일 후에 수거한다.

세포 배양 상층액으로부터 pIL4Rfc 융합 단백질의 정제

일시적으로 형질강화된 COS 세포로부터의 500ml의 상층액을 1.6ml의 단백질 A-세파로즈를 함유한 클립에서 배지 밭법으로 4°C에서 벌써 수확하고, 10배 용적의 세척 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 8.6), 150mM NaCl)으로 세척하고 융출 완충액(93.7 mM 시트로신: 100mM 시트로신 나트륨)을 사용하여 0.5ml의 분획으로 융출 시킨다. 처음의 9개 분획을 각 경우마다 2ml 트리스 완충액(pH 8.6) 0.1ml를 사용하여 즉시 중화시킨 후 융합하여, 생성된 단백질을 아이온 미소노트기(Centrifuge 30)에서 3회 농축/회석 주기로 수확함으로써 TNE 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EOTA)으로 끓인다. 이런 방법으로 IL4Rfc를 SOS-PAGE 전기영동에 의해 경제한다(참조: U.K. Lamelli, Nature 227(1970) 680-685). 한현제의 부재하에서, IL4Rfc는 SOS-PAGE에서 이채색(약 150KDa)처럼 나타난다.

정제된 IL4Rfc의 생물학적 활성

IL4Rfc 단백질은 막-결합형 융합한 IL-4 수용체와 동일한 전화도($K_d = 0.5nM$)로 ^{125}I -방사선 표지된 IL-4에 결합한다. IL4Rfc 단백질은 10 내지 1000ng/ml 농도에서 IL-4-의존성 세포주 CTLHuIL-4R1 클론 [이창조: Izquierdo 등, loc. cit.]의 증식을 억제한다. 또한, IL4Rfc 단백질은, 예를 들어, 레비트 항-사향 IgG로 미리 표시된 미세역가 플레이트에 Fc 부분을 경유하여 결합할 수 있고 또한 상기 형태에서 높은 친화도를 가지고 이의 리간드와 결합하기 때문에, IL-4 결합 경쟁을 선별시키는데 있어서 막을하게 적합하다.

[실시예 3]

에리트로포이에틴 융합 단백질

성숙한 에리트로포이에틴(EPO)은 166개 아미노산으로 구성된 단백질이고 적혈구의 발달에 필수적이다. 이것은 적혈구의 전구체 세포의 성숙 및 막단 분화를 자극한다. 사람 EPO에 대한 cDNA가 클론되었으며 [증조: 유럽 공개특허 공보 제0 267 678호] 이것은 성숙한 EPO의 166개의 아미노산 및 분비에 필수적인 22개의 아미노산의 시그널 펩티드를 포함하였다. cDNA는 유전자 조작은 포유동물 세포에서 재조합 작용성 EPO를 제조하는데 사용할 수 있으며 EPO는 다양한 원인의 반발증상(예: 급성 신부전증과 연관된 증상)의 치료를 위해 임상학적으로 사용될 수 있다.

간단한 경제 및 개선은 약물동력학적 특성 때문에, 본 발명에 따른 면역글로불린 융합 단백질로서의 EPO의 합성은 특히 유리하다.

에리트로포이에틴 융합 단백질을 암호화하는 하이브리드 플라즈미드 pEPORfc의 제작

이 제작은 실시예 2(선택: IL-4 수용체 융합 단백질을 암호화하는 하이브리드 플라즈미드 pIL-4Rfc의 제작)에 기술된 것과 유사하게 수행한다. 벡터 pES1(증조: 유럽 공개특허 공보 제0 267 678호)에서 물은 EPO cDNA의 개시코돈의 근처에 있는 서열(A: 5' GATCGATCTCGATCCCTGTCCTGCAAGCTCCCTGTGTACAGC 3') 및 정지코돈의 근처에 있는 서열(B: 5' CTGGAATCTCGATCCCTGTCCTGCAAGCTCCCTGTGTACAGC 3')과 하이브리드화 할 수 있는 2개의 올리고뉴클레오티드를 형성한다. 이들중에서, 올리고뉴클레오티드 A는 암호화 쇄의 서열과 부분적으로 동종성이고 올리고뉴클레오티드 B는 비-암호화 쇄와 부분적으로 동종성이다(제7도 참조). 열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한 증폭은 암호화 쇄를 기준으로 하여, 개시 코돈의 융복의 5' 일단에 있는 XbaI 부위를 형유하는 DNA 단편(598 bp)을 초래하는데, 여기서, EPO의 두 번째의 C-말단은 아미노산 전기에 대한 코돈(Asp)이 3' 일단은 BamHI 부위로 존재한다. BamHI 절단 부위에 있는 팁드 프레임은 pCD4E 강마 1에 있는 BamHI 부위와의 연결이 EPO cDNA의 개시 코돈에서부터 IgG1의 정지코돈에 걸쳐 연속적인 팁드 프레임과의 유전자 융합을 초래하도록 하는 것이다. 목적하는 단편을 수득하고, XbaI 및 BamHI으로 처리한 후, 상기와 같이 XbaI/BamHI으로 절단시킨 벡터 pCD4E 강마 1에 연결시킨다. 생성된 플라즈미드를 pEPORfc라고 명명한다(제8도 참조).

(57) 청구의 범위

청구항 1

IL-4 수용체, IL-7 수용체, G-CSF 수용체, GM-CSF 수용체 및 에리트로포이에틴 수용체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 시토킨 수용체 또는 성장 인자 수용체의 세포외 부분 또는 이의 일부, 및 IgG, IgM, IgA 및 IgE로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 면역글로불린 분자의 불변부로 이루어진 가용성 융합 단

四四

첨급학 3

제1학기에는 1학기와 2학기로 나누어 각각 15주씩 운영된다. 1학기는 1주 10시간, 2학기는 1주 12시간으로 운영된다.

첨구학 3

제2항에 있어서, 면역글로불린 부분이 사람 IgG1 종체의 불변부 또는 이의 단백질 A-결합 단편인 융합 단백질

첨급학 4

제1학기 암호학에서 율함이 희지 영역(hinge region)에서 발생하는 율함 단백질

제5장

제1항에 있어서, 면역글로불린에 융합된 단백질이 인터루킨-4(IL-4) 수용체의 세포외 부분 또는 이의 일부인 융합 단백질

제2부 6

제1항에 있어서, 면역글로불린에 포함된 단백질이 IL-7 수용체의 세포외 부분 또는 이의 일부인 헬프 단백질

四

八 論說

제1항에 의거한 면밀한 통찰권에 충합되는 다른 점이 예상되는 표지에 흰 수표지의 세포와 표지를 또는 이의 일

부인 음암

첨부 11

단 응합 단백질을 양호화하는 DNA를 포유동물 세포 발현 시스템에 도입시키고 발현시킨 후, 생성된 단백질을 청구된 특징으로 하여, 제1항에 청구된

69

৬৪

高麗古事記傳音釋卷之二

181 ACAAACTGTGCGAGATATAATTAACTTGGAAATCACTTAATTTCAGACAAATTTC
TGTGTTATGACCCGTCGTATATAATTAACCTTTAGTTGATTAAAGTTCTGTAAAC 260

721 AACTACTGTTTCAGTGGTCAAGCACTATTTCCCTCCCGAACAGTTAACCGGAAAGACTACA 780

도면26

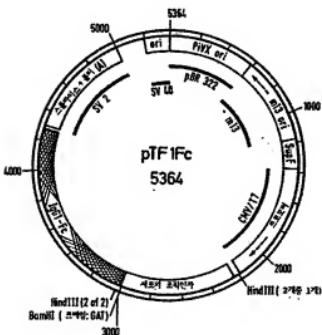
도면2c

| | | |
|--|------|------|
| 1210 | 1230 | 1250 |
| CATTCCTGGTTTGCATCAGCATTAGTCACTTGAGATGACTACACCA | | |
| 1270 | 1290 | 1310 |
| ATGCCAAGTTTAAATTTCACCCATGACCTTTGACATAGCATCTTGGATT | | |
| 1330 | 1350 | 1370 |
| ATATTCGGCACTTAAAGGTTAACCGATGACCTTTGACATAGCATCTTGGATT | | |
| 1390 | 1410 | 1430 |
| AAAAAATCCTGGTTGGACTTTGAAAGCTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTC | | |
| 1450 | 1470 | 1490 |
| TGCTCTCTGGTGGCCAGGCTGGAGTCAGTAGACATCTCGGGCTACTTGACACCTGG | | |
| 1510 | 1530 | 1550 |
| CTCTCGGGTTGACGAACTTCTGGCTGAGCCCTGGAGTAGCTGGGATTACAGCTGG | | |
| 1570 | 1590 | 1610 |
| ACTACCAAGCCCAAGCTAATTTTGATTTTTGAGATGGGGTTTACCATCTTGGC | | |
| 1630 | 1650 | 1670 |
| CAGCTGGTGTCTGAACTCTGACCTGAGTGTGACCCACCTTGGCTCCAAAGATGCT | | |
| 1690 | 1710 | 1730 |
| ATGATTATGGGGCTGGACCCATGGCCAGCGGAAAGCTTTGAGGGGCTGACTTCAT | | |
| 1750 | 1770 | 1790 |
| CCATGAGGAAAGTAAATGAGGGAAATTGGTGGCTTCTAGACCTTCTAACATAT | | |
| 1810 | 1830 | 1850 |
| GTCTATAATAGTGTGTTAGTTTCTTCTTCTAGGAAATCATTTGGAAATTCAACAC | | |
| 1870 | 1890 | 1910 |
| AACTGGGCAACCTTGTATTAAATGTGTTAGTGGCAGGACACATTGGTATTCTGGGCAAGT | | |
| 1930 | 1950 | 1970 |
| TCTTAATATGCTTACATCTGCACTTTAACCTGACTTAACTGGGATTAAACATTGGAGAG | | |
| 1990 | 2010 | 2030 |
| CTAACATATTTTATAAGACTACTATACAAACATACAGGTTTATGATTTAAGGACTCTTA | | |
| 2050 | 2070 | 2090 |
| AAAGCTCTATGGTGGAGATTGATATATATAATTTTTAAAGGGTTTCTATATGGGGAT | | |
| 2110 | 2130 | 2150 |
| TTCTATTTATGTAAGGTAATATGTTCTATTGATATATAATTGAGATAATTATTAATAT | | |
| 2170 | | |
| ACTTTAAATAAAAGGGACTGGGAAATTGTT | | |

도면3

세로마 호메린 할란 | 차향단 영역적 출발점

도 014



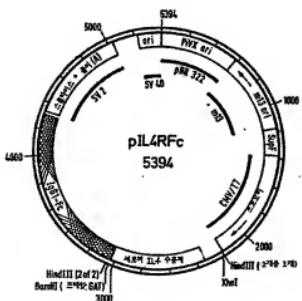
도연5

```

세계적 도약한 일본 1. 학문적 성과의 융합성
It's a good example of how the Japanese have been able to learn and adapt to Western culture and technology. Their focus on education and innovation has allowed them to become a global leader in various fields, such as technology, engineering, and business. This is a testament to the resilience and adaptability of the Japanese people.

```

도면6



도연7

도연8

